

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.10.007

· 临床研究 ·

肺鳞状细胞癌中 PTHLH 基因表达与抗肿瘤免疫的相关性研究

赵海龙, 朱小康, 李斌, 郑凤长, 白悦(甘肃省肿瘤医院 胸外科, 甘肃 兰州 730050)

[摘要] **目的:** 分析甲状旁腺激素样激素(PTH LH)基因与肺鳞状细胞癌(LSCC)患者预后及其与肿瘤微环境(TME)免疫细胞浸润的相关性。**方法:** 通过UALCAN、TIMER、cBioPortal数据库在泛癌水平分析 PTH LH 在泛癌中的表达情况, 运用Kaplan-Meier Plotter数据库分析 PTH LH 在 LSCC 中的表达及其与患者的预后关联。选用2017年1月至2020年12月在甘肃省肿瘤医院手术切除的24例LSCC患者的癌及癌旁组织标本, 用qPCR和WB法分别检测LSCC组织中 PTH LH mRNA和蛋白的表达, 用qPCR法检测各种趋化因子和MHC分子的表达水平。采用TIMER数据库联合CIBERSORT反卷积法分析 PTH LH 基因表达和LSCC的TME中免疫细胞浸润的关系。**结果:** LSCC组织中 PTH LH mRNA和蛋白的表达水平均显著高于癌旁组织(均 $P<0.05$), 且 PTH LH 高表达LSCC患者的OS明显缩短($P<0.01$)。PTH LH 的表达与LSCC患者TME密切相关($P<0.01$)。PTH LH 的表达与B细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、中性粒细胞和DC等免疫浸润呈显著负相关($r=-0.142$ 、 -0.123 、 -0.224 、 -0.166 、 -0.213 , 均 $P<0.01$)。PTH LH 高表达抑制趋化因子、MHC分子的表达, 从而抑制炎症反应、免疫浸润、抗肿瘤免疫反应等。PTH LH 的表达与免疫检查点分子CTLA-4、PDCD1、TIGIT呈负相关($r=-0.340$ 、 -0.441 、 -0.38 , 均 $P<0.01$)。**结论:** PTH LH 与肿瘤免疫抑制相关, 有望成为预测LSCC患者预后和免疫治疗效果的潜在生物标志物。

[关键词] 肺鳞状细胞癌; 甲状旁腺激素样激素; 肿瘤微环境; 免疫浸润; 抗原提呈; 免疫检查点抑制剂

[中图分类号] R734.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)10-0911-10

Correlation between PTHLH gene expression and anti-tumor immunity in lung squamous cell carcinoma

ZHAO Hailong, ZHU Xiaokang, LI Bin, ZHENG Fengchang, BAI Yue (Department of Thoracic Surgery, Gansu Cancer Hospital, Lanzhou 730050, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the association of parathyroid hormone-like hormone (PTH LH) with the prognosis as well as the immune cell infiltration in the tumor microenvironment (TME) of patients with lung squamous cell carcinoma (LSCC). **Methods:** The expression pattern of PTH LH in pan-cancer was analyzed by UALCAN, TIMER, and cBioPortal databases, and the Kaplan-Meier Plotter database was used to analyze the relationship between the expression of PTH LH in LSCC and the prognosis of patients. The cancer tissues and para-cancerous tissues of 24 LSCC patients who underwent surgical resection in the Gansu Cancer Hospital from January 2017 to December 2020 were selected for this study. The mRNA and protein expression levels of PTH LH in LSCC tissues were verified by qPCR and WB, and the expression levels of various chemokines and MHC molecules were detected by qPCR. Then, the correlation between PTH LH expression and immune infiltration in the TME of LSCC was investigated by the TIMER database combined with CIBERSORT deconvolution method. **Results:** Compared with para-cancerous tissues, the mRNA and protein expression levels of PTH LH were significantly higher in LSCC tissues (both $P<0.05$). Furthermore, the OS of LSCC patients with high PTH LH expression was significantly shortened ($P<0.01$). In addition, the expression of PTH LH was closely related to the TME in patients with LSCC ($P<0.01$). The expression of PTH LH was negatively correlated with immune infiltrates, including B cells, CD8⁺T cells, CD4⁺T cells, neutrophils and dendritic cells ($r=-0.142$, -0.123 , -0.224 , -0.166 , -0.213 , all $P<0.01$). Overexpression of PTH LH inhibited the expression of chemokines and MHC molecules, thereby inhibiting inflammatory responses, immune infiltration, anti-tumor immune responses, etc. Additionally, the expression of PTH LH was negatively correlated with the levels of immune checkpoint molecules CTLA-4, PDCD1 and TIGIT ($r=-0.340$, -0.441 , -0.38 , all $P<0.01$). **Conclusion:** PTH LH is associated with tumor immunosuppression and is expected to serve as a potential biomarker for predicting immunotherapy effect and prognosis in patients with LSCC.

[Key words] lung squamous cell carcinoma (LSCC); parathyroid hormone-like hormone (PTH LH); tumor microenvironment (TME); immune infiltration; antigen presentation; immune checkpoint inhibitor (ICI)

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(10): 911-920. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.10.007]

[基金项目] 甘肃省卫生健康行业科研计划项目(No.GSWSKY2020-40)

[作者简介] 赵海龙(1982—),男,硕士,主治医师,主要从事肺癌免疫治疗研究,E-mail: heyulong777@163.com

[通信作者] 白悦,E-mail: baiyue996@163.com

2022年全球癌症统计数据^[1]显示,肺癌发病率居第2位,病死率居第1位,其中40%~50%为肺鳞状细胞癌(lung squamous cell carcinoma, LSCC),患者5年生存率低于15%^[2]。近年来,免疫治疗极大地改善了晚期LSCC患者的预后^[3]。研究结果^[4-5]表明,单药用于未经选择的晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的有效率仅在20%左右。如何甄别潜在获益人群,提高有效率是肺癌免疫治疗领域亟待解决的问题。恶性肿瘤相关高钙血症是晚期肿瘤患者常见并发症,主要由肿瘤分泌的甲状旁腺激素样激素(parathyroid hormone-like hormone, PTHLH)引起,在LSCC最为常见^[6],是患者的不良预后因素^[7]。肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)、免疫相关的标志物表达与免疫治疗的疗效密切相关^[8-9],目前尚不清楚LSCC中PTHLH表达对TME及免疫治疗疗效的影响。本研究利用公共数据库,分析PTHLH基因在LSCC中的表达与患者预后的关联,评估其与TME的相关性,探讨PTHLH在免疫治疗中的可能作用机制,为深入研究PTHLH基因对LSCC发展及免疫治疗疗效影响的作用机制提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 PTHLH数据的来源

从TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载LSCC患者的转录组数据。基于UALCAN数据库(<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>)分析PTHLH在不同肿瘤类型中的表达情况, TIMER数据库(<http://timer.cistrome.org/>)分析PTHLH在不同肿瘤癌与癌旁组织中的表达差异, cBioPortal数据库(<https://www.cbioportal.org/>)分析PTHLH在不同肿瘤类型以及LSCC中基因变异的情况。

1.2 组织标本及主要试剂

收集2017年1月至2020年12月在甘肃省肿瘤医院手术切除的24例LSCC患者癌和癌旁组织(距离肿瘤边缘 ≥ 2 cm)标本,肿瘤切除后立即置于 -80°C 冰箱冻存。术前所有患者均签署知情同意书,研究方案经医院医学伦理委员会批准。

PrimeScript RT试剂盒(RR037B)购自TaKaRa公司, qPCR SYBR Green Master Mix试剂盒(Q111-02/03)购自诺唯赞公司,抗PTHLH抗体(ab239527)、 β -actin抗体(ab8226)、鼠二抗(ab97040)均购自Abcam公司。

1.3 ssGSEA分析

使用R软件的GSVA包评估TCGA LSCC表达谱数据中每一个肿瘤组织样本亚炎症信号通路(parainflammation)、促炎信号通路(inflammation-promoting)、肿瘤浸润T淋巴细胞(tumor infiltrating T

lymphocyte, TIL)、抗原提呈细胞(antigen presenting cel, APC)共刺激信号通路、T细胞共刺激信号通路、I型干扰素反应通路、II型干扰素反应通路分值。

1.4 肿瘤浸润免疫细胞的相关性分析

基于在线数据库TIMER(<http://timer.cistrome.org/>)分析PTHLH基因表达水平与肿瘤浸润免疫细胞的相关性。CIBERSORT是一种分析工具,用于量化浸润免疫细胞组成分数。从CIBERSORT网站(<http://cibersort.stanford.edu/>)下载LM22注释基因签名矩阵,使用CIBERSORT算法计算TME中浸润免疫细胞丰度。

1.5 差异分析

使用R软件的Estimate包计算每个LSCC组织样品的免疫细胞评分(Immune score)、基质细胞评分(Stromal score)和综合评分(Estimate score),综合评分是免疫细胞评分和基质细胞评分之和,得分越高代表TME中相应成分更高。基于TCGA数据库中的LSCC数据,利用R软件的limma和edgeR软件包对免疫细胞评分、基质细胞评分、综合评分进行差异分析;用同样的方法对免疫细胞趋化因子相关基因、抗原提呈相关基因等进行差异分析。

1.6 qPCR法检测LSCC组织中PTHLH、趋化因子、抗原提呈相关基因的表达

按照TRIzol试剂抽提总RNA,采用分光光度计对RNA浓度及纯度进行测定,并用PrimeScript RT试剂盒合成相应的cDNA和荧光染料SYBR-Green对扩增产物进行qPCR检测。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性1 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,延伸15 s,共40个循环。结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因mRNA的相对表达量。实验重复3次。通过PrimerBank(<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>)数据库查找PTHLH、趋化因子、抗原提呈相关的基因的引物,并在BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)网站的Refseq-RNA数据库中行序列比对以获取特异性的引物序列(表1)。

1.7 WB法检测LSCC组织中PTHLH蛋白的表达

各取50 g LSCC组织和癌旁组织标本,加入蛋白裂解液,用眼科剪将组织剪碎后研磨,冰上裂解30 min,12 000 $\times g$ 离心10 min后取上清液。应用BCA蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度,100 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 min,进行12% SDS-PAGE,将蛋白质转至PVDF膜上,在5% BSA封闭液处理1 h,加入抗PTHLH一抗(1:500)、 β -actin一抗(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST洗3次(10 min/次)后,加入鼠二抗(1:2 000)室温处理1 h, TBST洗涤后,添加电学发光液显影,采用Tanon 5200全自动化学发光图像分析系统拍照,并用ImageJ软件分析蛋白条带的灰度值。实验重复3次。

表1 引物序列

基因名称	序列(5'-3')
PTHLH	F: AAGGTGGAGACGTACAAAGAGC R: CAGAGCGAGTTCGCCGTTT
CCL22	F: ATTACGTCCGTTACCGTCTGC R: TCCCTGAAGGTTAGCAACACC
CXCL11	F: GACGCTGTCTTTGCATAGGC R: GGATTTAGGCATCGTTGTCCTTT
CXCL10	F: GTGGCATTCAAGGAGTACCTC R: TGATGGCCTTCGATTCTGGATT
CCL2	F: CAGCCAGATGCAATCAATGCC R: TGGAATCCTGAACCCACTTCT
CXCL9	F: CCAGTAGTGAGAAAGGGTCGC R: AGGGCTTGGGGCAAATTGTT
CCL5	F: CCAGCAGTCGTCTTTGTACAC R: CTCTGGGTTGGCACACACTT
CCL8	F: TGGAGAGCTACACAAGAATCACC R: TGGTCCAGATGCTTCATGGAA
CCL3	F: AGTTCTCTGCATCACTTGCTG R: CGGCTTCGCTTGTTAGGAA
CXCR4	F: ACGCCACCAACAGTCAGAG R: AGTCGGGAATAGTCAGCAGGA
CCR1	F: CCTGCTGACGATTGACAGGTA R: TCTCGTAGGCTTTCGTGAGGA
CCR2	F: TGCAAAAAGCTGAAGTGCTTG R: CAGCAGAGTGAGCCACAAT
CCR4	F: AGAAGGCATCAAGGCATTTGG R: ACACATCAGTCATGGACCTGAG
HLA-A	F: GACCAGGAGACACGGAATGTG R: CCTCGTTCAAGGCGATGTAATC
HLA-B	F: CAGTTCGTGAGGTTTCGACAG R: CAGCCGTACATGCTCTGGA
HLA-C	F: CCATGAGGTATTTGTGGACCG R: TCTCGGACTCTCGTCGTCG
HLA-E	F: TTCCGAGTGAATCTGCGGAC R: GTCGTAGGCGAACTGTTTCATC
HLA-F	F: TGGCCCTGACCGATACTTG R: GCAGGAATTGCGTGTCTGTC
HLA-G	F: CACGCACAGACTGACAGAATG R: GCCATCGTAGGCATACTGTTC
DRA	F: AGTCCCTGTGCTAGGATTTTCA R: ACATAAACTCGCCTGATTGGTC
DRB1	F: CGGGGTTGGTGAGAGCTTC R: AACCACCTGACTTCAATGCTG
DOB	F: AGAGGTGACAGTGTACCCAGA R: CTCATTCTGATAGGGCCAG
DQA1	F: TCGCTCTGACCACCGTGAT R: AGGGACCGTAAAAGTGGTACAA
DQB1	F: GCGGGATCTTGCAGAGGAG R: ACTTTGATCTGGCCTGGATAGAA
DMA	F: CCTGCACACAGTGTACTGC R: CACCCGAGTGTCTGGGAA
DMB	F: ACCTGTCTGTTGGATGATGCT R: CGCAAGGGGCCATCTTATTCT
DOA	F: CCTACGACCCGCCTTCTA R: GGCCTCGCTTTTCTCAGG
DPA1	F: ATGCGCCCTGAAGACAGAATG R: ACACATGGTCCGCCTTGATG
DPB1	F: TGTCCACCAACCTGATCCGTA R: CCACGGTGACAGGACTATCCA
β -Actin	F: CTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGC R: CCAGGAAGGAAGGCTGGAAGAG

1.8 统计学处理

使用 SPSS22.0 和的 R4.0.4 软件进行数据分析。通过在线数据库 Kaplan-Meier Plotter (<https://kmplot.com/analysis/>) 分析 PTHLH 基因在肺癌及 LSCC 中表达水平与生存预后的关系, 并进行 Log-Rank 检验。PTHLH 表达水平与 LSCC 患者临床特征的相关性分析采用卡方检验, 基因表达的相关性分析采用 Spearman 相关分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

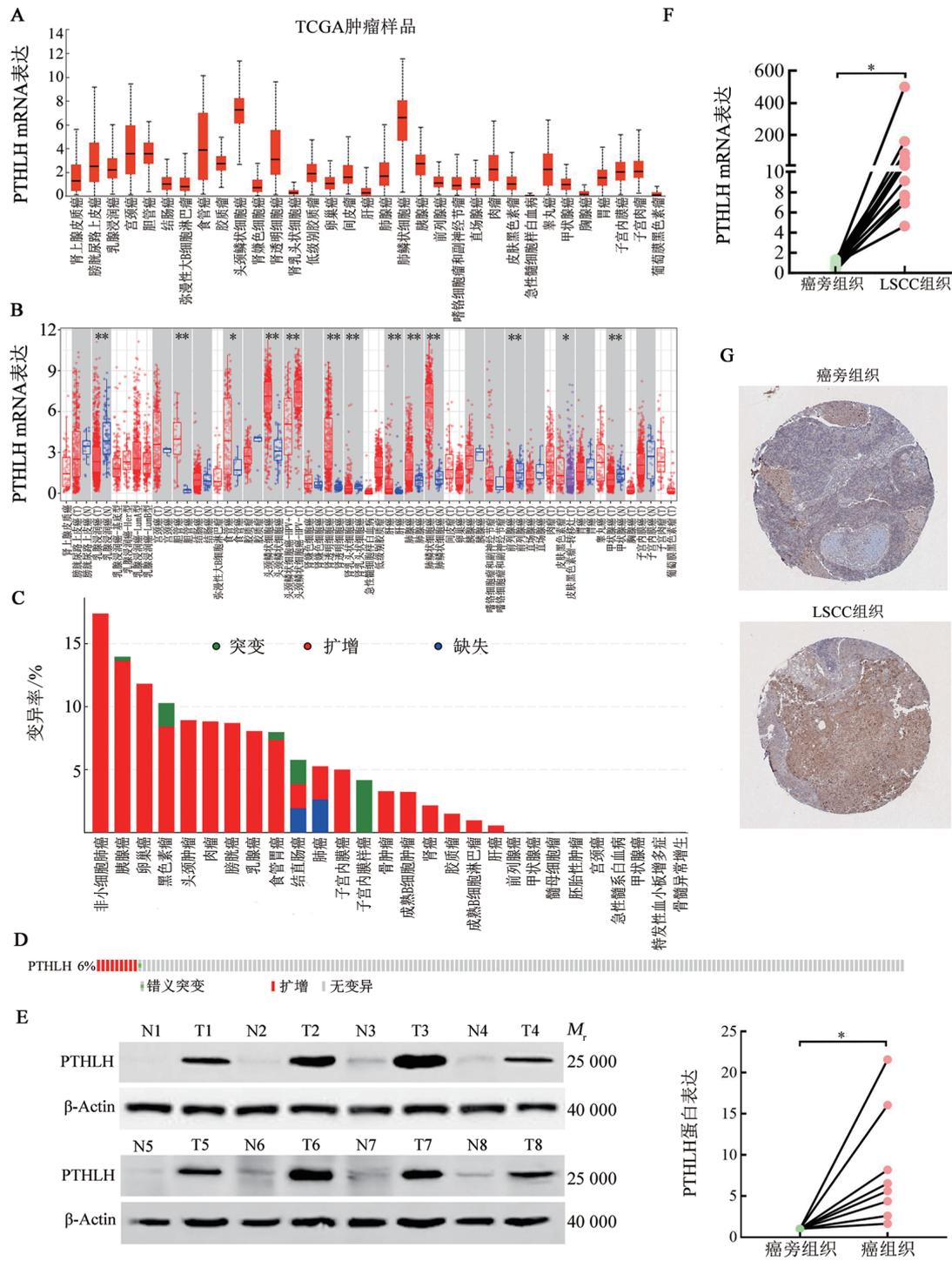
2.1 PTHLH 在 LSCC 组织中呈高表达

利用 UALCAN 数据库分析 TCGA 数据库中 33 种不同肿瘤组织中 PTHLH mRNA 表达水平, 结果发现 PTHLH mRNA 在 LSCC、头颈鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)、食管癌 (esophageal carcinoma, ESCA) 组织中表达显著高于其他类型肿瘤 (图 1A)。进一步通过 TIMER 数据库分析 24 种实体瘤中癌与癌旁组织中 PTHLH 基因表达谱数据, 与癌旁组织比较, 宫颈癌、胆管癌 (cholangiocarcinoma, CHOL)、ESCA、HNSCC、肾透明细胞癌 (kidney renal clear cell carcinoma, KIRC)、肺腺癌、LSCC、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤组织中 PTHLH mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 1B)。其中, 在 LSCC、CHOL、ESCA、HNSCC、KIRC 上调尤为明显 (均 $P < 0.01$, 图 1B), 提示 PTHLH 基因在这 5 个癌肿的发生发展中可能发挥重要的作用。同时发现, PTHLH 基因在多种肿瘤中高频扩增, 其中以 NSCLC 尤为明显 (图 1C)。结合 TCGA 中癌及与癌旁组织中 PTHLH mRNA 表达水平的变化情况, 提示 PTHLH 基因在 LSCC 的发生发展中可能具有重要的作用。随后, 分析了 LSCC 中 PTHLH 的基因变异情况, 结果发现 6% 的 LSCC 患者可发生 PTHLH 基因的高频扩增 (图 1D)。

为验证公共数据库的数据, 对 LSCC 患者的癌及癌旁组织标本进行 qPCR 实验结果证实, LSCC 组织中 PTHLH mRNA 表达水平显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$, 图 1F); WB 法检测结果也得到了一致的结果 ($P < 0.05$, 图 1E)。在 HPA 公共数据库免疫组织化学数据中也发现, LSCC 组织中 PTHLH 蛋白的阳性表达率显著高于癌旁组织 (图 1G)。以上实验结果表明, PTHLH 在 LSCC 组织中显著高表达, 与 LSCC 的发生发展密切相关。

2.2 PTHLH 高表达的肺癌患者 OS 率较低

为评估 PTHLH 基因表达水平与 LSCC 患者预后的关系, 采用 Kaplan-Meier Plotter 数据库研究了肺癌中 PTHLH 基因表达水平对患者生存预后的影响。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A、B: 利用TIMER、TCGA 数据库分析不同类型肿瘤组织及其癌旁组织中 PTHLH 表达; C、D: 利用 cBioPortal 数据库分析 PTHLH 基因表达变化; E: WB 法检测 LSCC 组织中 PTHLH 蛋白的表达; F: qPCR 法检测 LSCC 组织中 PTHLH mRNA 的表达; G: HPA 数据库中免疫组化染色法检测 LSCC 组织中 PTHLH 蛋白的表达

图1 采用 UALCAN 数据库分析不同肿瘤组织中 PTHLH 表达情况

结果发现, PTHLH 表达水平与 LSCC 患者 OS 相关, PTHLH 高表达患者的 OS 明显短于低表达患者 ($P < 0.01$, 图 2A)。在 TCGA 数据库来源的 LSCC 患者中也得到了一致的结论 ($P < 0.05$, 图 2B), 提示 PTHLH 高表达可促进 LSCC 的发生发展, 缩短患者

的 OS。为进一步研究 LSCC 中 PTHLH 表达与临床特征之间的关系, 将 TCGA 数据库中 501 例 LSCC 患者以 PTHLH 表达的中位值分为高表达组 (PTHLH-H) 和低表达组 (PTHLH-L), 结果 (表 2) 发现, PTHLH 表达与性别相关联 ($\chi^2 = 7.163$, $P < 0.01$), 在男性患者中

PTHLH 高表达的占比较多,而在女性患者中 PTHLH 高表达的占比较少;但 PTHLH 表达与患者年龄、吸烟

指数、T 分期、淋巴结转移、远处转移以及 AJCC 分期均无明显相关性。

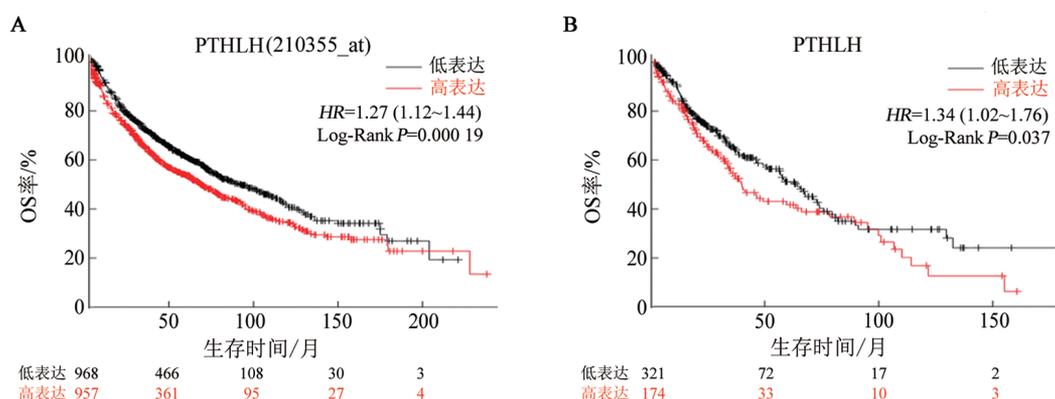


图2 不同 PTHLH 基因表达 NSCLC 患者(A)和 TCGA 中 LSCC 患者(B)的生存曲线

表2 TCGA 数据库 LSCC 队列中 PTHLH 表达水平与临床特征的相关性[n(%)]

临床特征	样本量(N=501)	PTHLH-H(n=250)	PTHLH-L(n=250)	χ^2	P
年龄/岁				0.025	0.873
≥60	401(80.04)	199(79.28)	202(80.80)		
<60	91(18.16)	46(18.33)	45(18.00)		
未知	9(1.80)	6(2.39)	3(1.20)		
性别				7.163	0.007
男	371(74.05)	199(79.28)	172(68.80)		
女	130(25.9)	52(20.72)	78(31.20)		
吸烟指数				1.021	0.312
轻度吸烟(≤200)	423(84.43)	214(85.26)	209(83.60)		
中度吸烟(200~400)	1(0.20)	0(0)	1(0.4)		
重度吸烟(≥400)	0(0)	0(0)	0(0)		
未知	77(15.37)	37(14.74)	40(16.00)		
T分期				3.533	0.316
T1	114(22.75)	49(19.52)	65(26.00)		
T2	293(58.48)	156(62.15)	137(54.80)		
T3	71(14.17)	35(13.94)	36(14.40)		
T4	23(4.59)	11(4.38)	12(4.80)		
N分期				2.227	0.527
N0	319(63.67)	167(66.53)	152(60.80)		
N1	131(26.15)	60(23.90)	71(28.40)		
N2	40(7.98)	18(7.17)	22(8.80)		
N3	5(1.00)	3(1.20)	2(0.80)		
未知	6(1.20)	3(1.20)	3(1.20)		
M分期				1.279	0.258
M0	411(82.04)	205(81.67)	206(82.40)		
M1	7(1.40)	5(2.00)	2(0.80)		
未知	83(16.57)	41(16.33)	42(16.80)		
AJCC分期				2.279	0.517
I	244(48.70)	127(50.60)	117(46.80)		
II	162(32.34)	77(30.68)	85(34.00)		
III	84(16.77)	40(15.94)	44(17.60)		
IV	7(1.40)	5(2.00)	2(0.8)		
未知	4(0.80)	2(0.80)	2(0.8)		

2.3 PTHLH高表达的LSCC组织中免疫细胞浸润减少

基于TCGA数据库中LSCC的表达谱数据分析结果发现,PTHLH表达水平会影响肿瘤的综合评分。PTHLH-L组相较于PTHLH-H组肿瘤综合评分值更高,提示PTHLH-L组TME中基质细胞和免疫细胞相较于PTHLH-H组更丰富($P<0.01$,图3A)。进而对比了

两组间免疫细胞和基质细胞评分,结果发现PTHLH-H组免疫细胞和基质细胞评分均低于PTHLH-L组(均 $P<0.01$,图3B、C)。分析结果提示,PTHLH-H组的肿瘤组织中的免疫细胞和基质细胞均少于PTHLH-L组,即PTHLH的表达上调可能导致TME中免疫细胞浸润减少,出现免疫排斥表型。

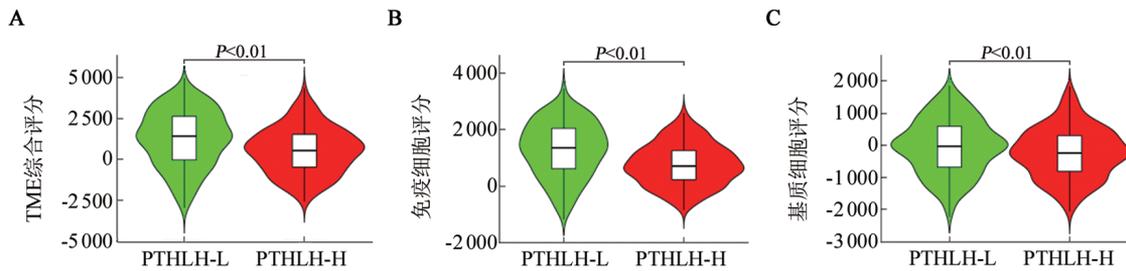


图3 PTHLH高、低表达组间TME综合评分(A)、免疫细胞评分(B)和基质细胞评分(C)差异小提琴图

2.4 PTHLH高表达的TME中炎症信号通路受抑制

为进一步探究PTHLH表达上调促进免疫排斥的原因,将PTHLH的表达水平与亚炎症信号通路、促炎信号通路评分进行相关性分析发现,随着PTHLH的表达水平的升高,亚炎症信号通路、促炎信号通路的评分均随之明显下调,表明PTHLH的表达升高可抑制抗肿瘤免疫炎症的形成(图4A)。进一步分析PTHLH-L组与PTHLH-H组间4种不同免疫细胞趋化因子的表达水平,发现PTHLH-H组相较于PTHLH-L组各种细胞趋化因子的表达水平均一致地下调,即PTHLH的表达上调可抑制各种免疫细胞趋化因子的上调,进而影响免疫细胞向肿瘤的趋化过程(图4B)。在24例LSCC患者肿瘤组织中,依照PTHLH mRNA表达水平,以中位数将其均分为PTHLH-H组和PTHLH-L组,PTHLH-L组各种细胞趋化因子的表达水平均高于PTHLH-H组,与TCGA中LSCC的数据趋势一致(图4C)。以上数据提示,PTHLH的表达上调可能通过抑制抗肿瘤免疫炎症的发生,下调各种免疫细胞趋化因子的表达,从而抑制免疫细胞的浸润。

2.5 PTHLH高表达的肿瘤组织中免疫细胞浸润减少

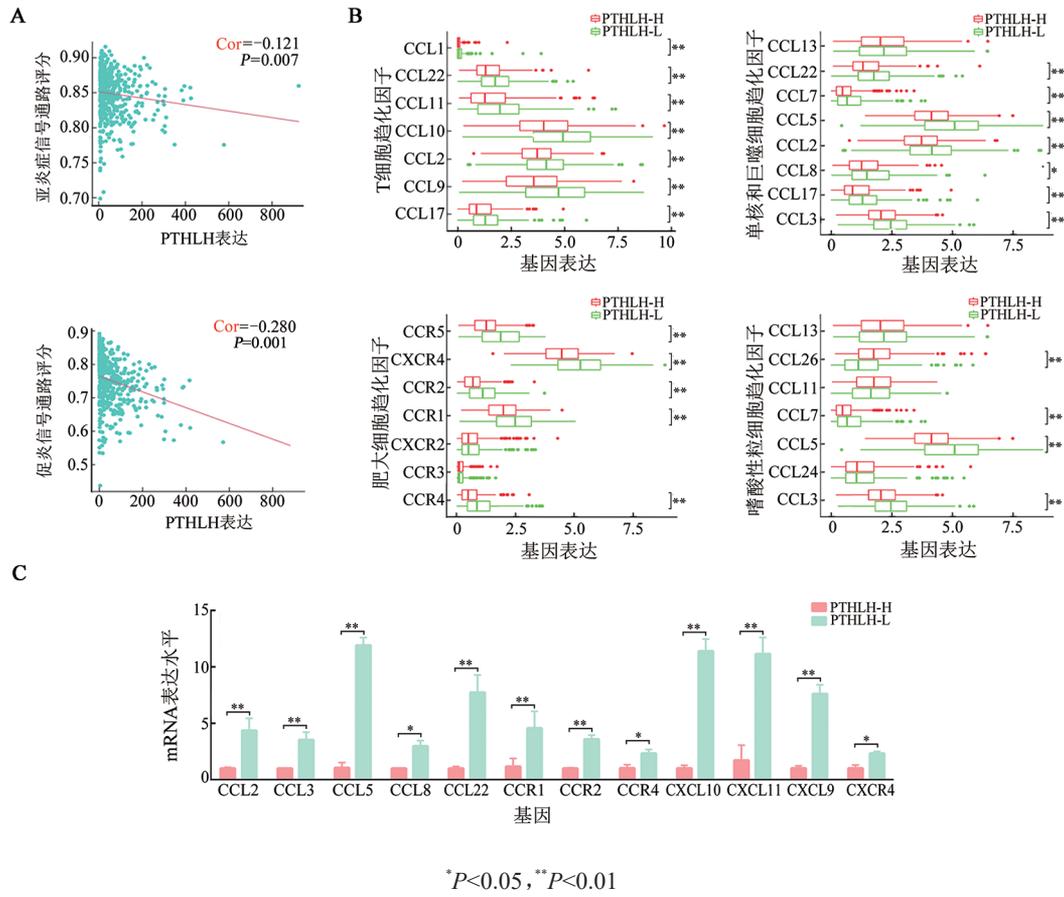
通过分析PTHLH的表达水平与肿瘤浸润淋巴细胞的相关性,结果显示PTHLH的表达水平与肿瘤浸润淋巴细胞呈负相关($r=-0.306$, $P<0.01$;图5A),表明PTHLH的表达升高可抑制淋巴细胞的浸润。采用Spearman检验分别分析PTHLH表达与6种免疫浸润细胞(B细胞、 $CD8^+$ T细胞、 $CD4^+$ T细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和DC)丰度之间的相关性,结果发现PTHLH表达与B细胞、 $CD8^+$ T细胞、 $CD4^+$ T细胞、

嗜中性粒细胞和DC均呈显著负相关($r=-0.142$ 、 -0.123 、 -0.224 、 -0.168 、 -0.213 ,均 $P<0.01$;图5B)。进一步通过CIBERSORT算法计算TME浸润免疫细胞丰度,并对比了PTHLH-L组与PTHLH-H组间肿瘤浸润免疫细胞差异。结果显示,相比于PTHLH-L组,PTHLH-H组抗肿瘤相关的 $CD8^+$ T细胞、活化的 $CD4^+$ 记忆T细胞、辅助性T细胞、M1型巨噬细胞浸润丰度明显下降(均 $P<0.01$,图6)。以上结果表明,PTHLH在LSCC发生过程中的免疫细胞浸润中起关键作用,显著抑制了抗肿瘤免疫细胞的浸润。

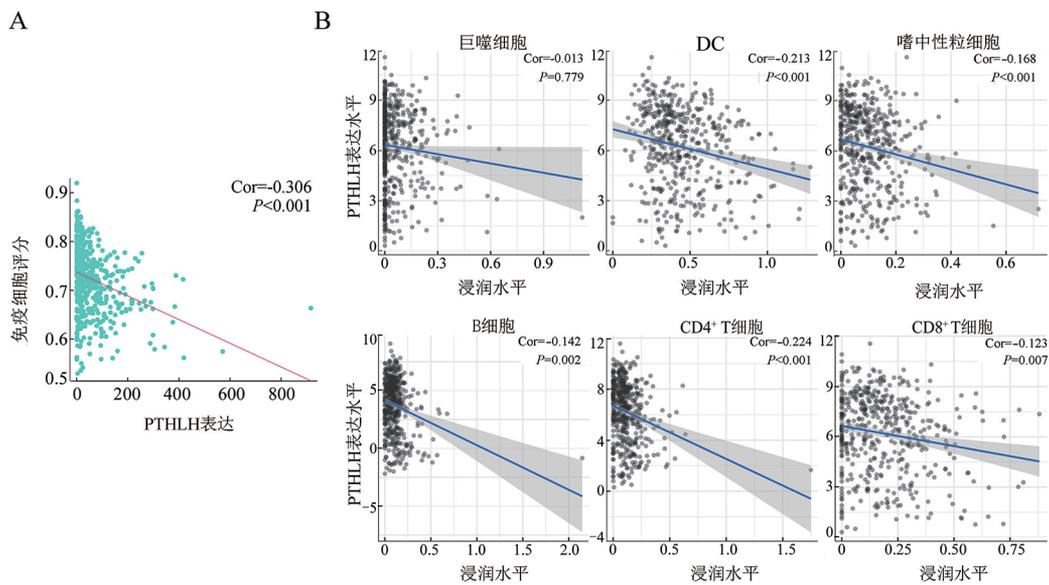
2.6 PTHLH高表达的肿瘤组织抗原提呈活化受抑制

有效的T细胞应答依赖于抗原的提呈和APC对T细胞的诱导。因此,本实验提取了LSCC转录组中与抗原提呈相关的基因的表达水平,分析它们在PTHLH-L组和PTHLH-H组间的差异表达,发现抗原提呈相关的基因在PTHLH-H组表达较PTHLH-L组表达明显下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图7A),表明PTHLH的表达上调会导致肿瘤抗原提呈过程的下调,进而可能影响APC对T细胞的诱导活化。qPCR法检测结果(图7B、C)显示,对24例LSCC患者肿瘤组织进一步分析,发现PTHLH-L组肿瘤组织中MHC I/II类分子的表达水平均显著高于PTHLH-H组的肿瘤组织(均 $P<0.01$),与在TCGA中LSCC数据分析得出的结论一致。通过ssGSEA算法对肿瘤组织中T细胞活化相关信号通路APC共刺激信号通路、T细胞共刺激信号通路、I型干扰素反应通路、II型干扰素反应通路进行评分,结果发现PTHLH基因表达水平与信号通路均呈负相关($r=-0.212$ 、 -0.281 、 -0.173 、 -0.136 ,均 $P<0.01$;图7D)。

上述数据表明, PTHLH 可能通过下调 LSCC 抗原提呈, 抑制 APC 对 T 细胞的刺激, 进而影响免疫细胞抗肿瘤免疫功能。



A: PTHLH 基因表达与亚炎症信号通路评分和促炎信号通路评分相关性分析; B: PTHLH 高、低表达组间各种趋化因子表达差异箱式图; C: qPCR 法检测 LSCC 组织中两组间各种细胞趋化因子的 mRNA 表达水平差异
图 4 PTHLH 基因表达与 TME 中炎症信号通路活化的相关性分析



A: PTHLH 基因表达与肿瘤浸润免疫细胞评分相关性分析; B: TIMER 数据库中 PTHLH 基因表达与巨噬细胞、DC、嗜中性粒细胞、B 细胞、CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞丰度的相关性分析
图 5 PTHLH 表达水平与 LSCC 患者 TME 中浸润免疫细胞的相关性分析

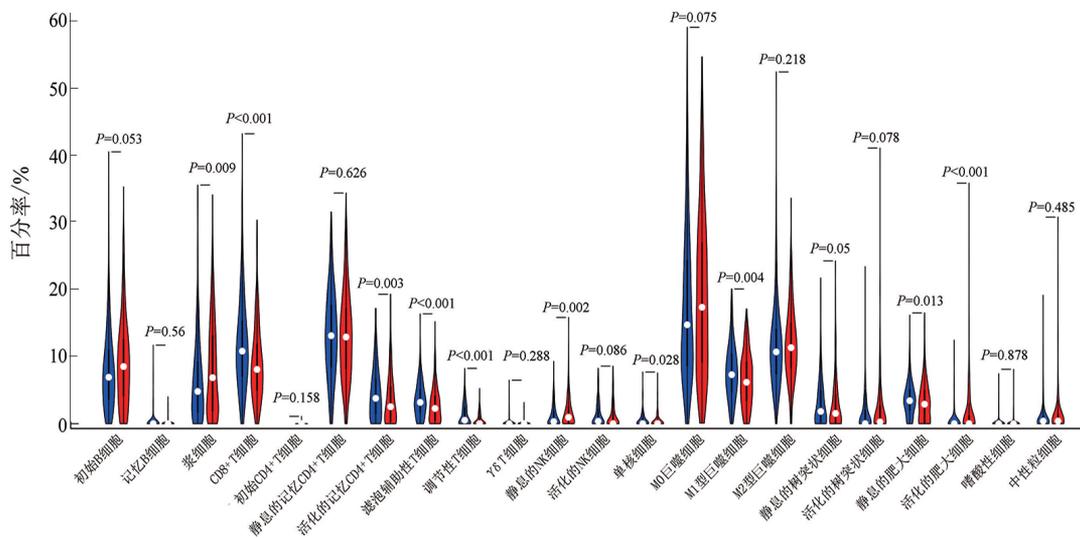
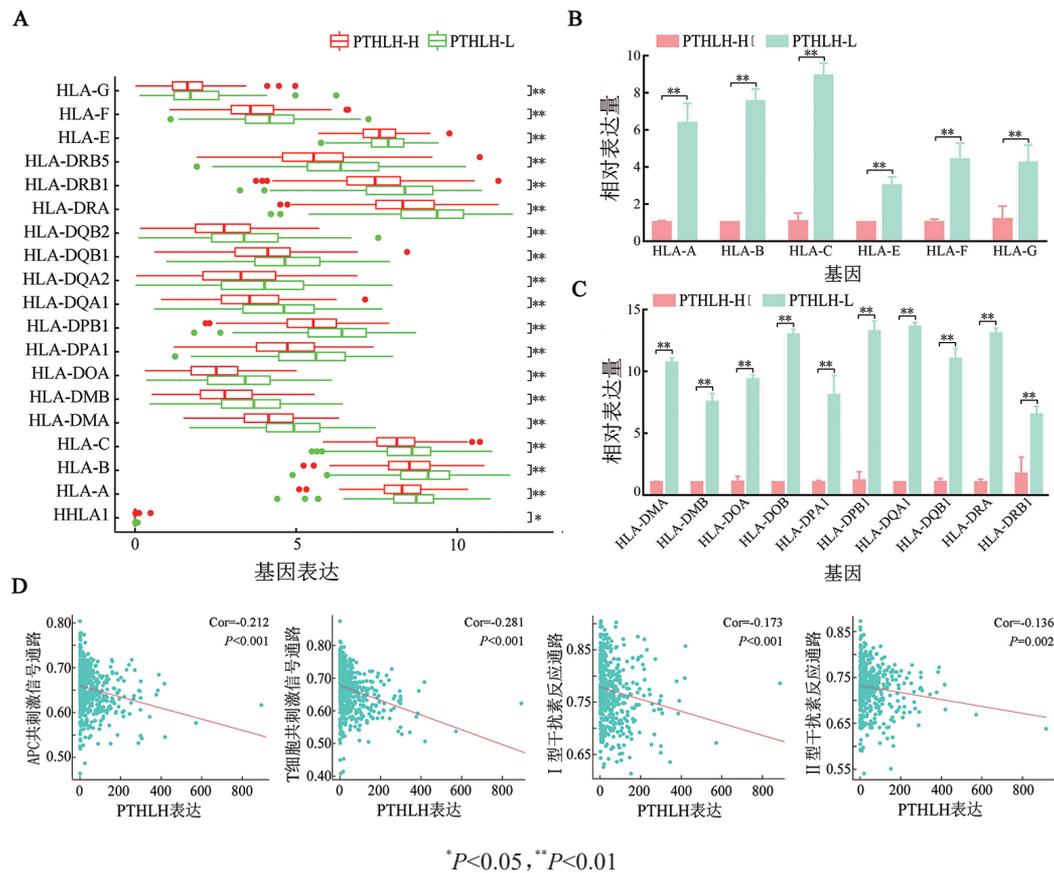


图6 基于CIBERSORT算法预测的22种免疫浸润细胞丰度在PTHLH高、低表达组间差异的小提琴图



A:PTHLH 高低表达组间MHC 分子表达差异箱式图;B、C:qPCR 法检测 24 例 LSCC 组织中 PTHLH 高、低表达组间 MHC I / II 类分子 mRNA 表达差异;D:PTHLH 基因表达与 T 细胞活化相关信号通路的相关性分析

图7 PTHLH 表达水平与 LSCC 抗原提呈活化的相关性分析

2.7 PTHLH 与免疫检查点相关基因表达水平呈负相关

既往研究结果^[10]发现,肿瘤组织高表达 CTLA-4、PDCD1、TIGIT 预示着肿瘤患者对相应的免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor, ICI) 的疗效更佳。本实验提取了 LSCC 转录组中 CTLA-4、PDCD1、

TIGIT 基因的表达数据,采用斯皮尔曼相关性检验分析 PTHLH 表达水平与免疫检测点相关基因 CTLA-4、PDCD1、TIGIT 表达水平的相关性,结果显示 PTHLH 表达水平与 CTLA-4、PDCD1、TIGIT 表达水平均呈负相关 ($r=-0.34$ 、 -0.441 、 -0.38 , 均 $P<0.01$; 图 8), 提示 PTHLH 高表达的患者对 ICI 治疗疗效不佳。

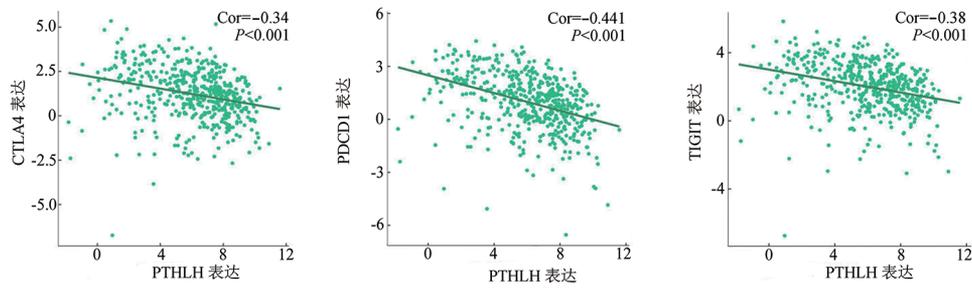


图8 PTHLH基因表达与CTLA4、PDCD1和TIGIT基因表达的相关性分析

3 讨论

PTHLH是一种副肿瘤蛋白,作为一种分泌因子,在体液性高钙血症中起着重要作用,可导致副肿瘤性高钙血症^[1]。PTHLH在肺癌、乳腺癌、头颈部癌、淋巴瘤和结直肠癌等肿瘤中表达上调,已被证明参与肿瘤发生发展的不同阶段。在结直肠癌中,PTHLH通过激活Rac1以整合素 $\alpha 6\beta 4$ 依赖性方式促进结直肠癌细胞迁移和侵袭^[2];在乳腺癌、骨肿瘤、口腔鳞状细胞癌中,PTHLH驱动小鼠肿瘤的发生、进展和转移,是潜在的治疗靶点^[3-5];在HNSCC中,PTHLH通过RUNX2调节促进肿瘤生长^[6]。在前列腺癌中,PTHLH通过整合素 $\alpha 6\beta 4$ 介导的磷脂酰肌醇3-激酶/Akt信号转导来调节细胞存活途径^[7];在胰腺癌中,PTHLH通过骨桥蛋白Spp1促进EMT,从而介导肿瘤细胞启动转移级联反应的能力^[8]。

但是,既往关于PTHLH在肺癌中的作用研究相对较少。有研究结果^[9]发现,PTHLH通过降低CDK2的激活来减缓肺癌细胞进入S期的进展,可以减缓肺癌的进展并延长患者的OS;但亦有研究结果^[9]发现,抗甲状旁腺激素相关蛋白抗体加唑来膦酸强化治疗重度联合免疫缺陷小鼠小细胞肺癌细胞骨转移。因此,目前关于PTHLH在肺癌中的作用机制尚不清楚,PTHLH对肿瘤免疫微环境的影响及免疫治疗的研究更是鲜见。本研究结果发现,PTHLH在鳞状细胞癌中表达较高,在LSCC中尤为明显;PTHLH在多种类型肿瘤组织中表达较癌旁组织显著上调,其中在LSCC组织中的上调程度最为明显,提示PTHLH在LSCC的发生发展中可能发挥着重要的作用。生存分析结果更进一步说明,PTHLH作为一个癌基因,其高表达可降低LSCC患者的OS。因此,有必要进一步深入探究PTHLH的表达水平变化对LSCC的影响,了解包括免疫细胞在内的TME将有助于揭示肿瘤发展的重要机制。本研究分析发现,PTHLH可影响TME的组分,进一步分析发现PTHLH高表达可抑制TME中的炎症反应及各种炎症趋化因子的表达,进而抑制各种免疫细胞向肿瘤组织中的趋化,包括

DC、B细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞等,从而抑制抗肿瘤免疫反应。肿瘤抗原在肿瘤诱导机体抗肿瘤效应过程中起很重要的作用。既往研究^[20]发现,MHC I类分子提呈功能的缺乏常常是导致肿瘤免疫逃逸的主要原因之一。因此,本研究探索了PTHLH的表达与MHC分子表达的相关性,发现相较于PTHLH低表达的肿瘤组织,PTHLH高表达的肿瘤组织MHC分子的表达均下调。且PTHLH的表达水平与APC和T细胞的激活及I/II型干扰素信号通路的活化呈负相关。总之,PTHLH可影响LSCC的TME,抑制抗肿瘤免疫细胞浸润及抗肿瘤免疫反应过程,进而促进肿瘤的进展,最终导致患者的生存预后不良。且PTHLH的表达水平与CTLA-4、PDCD1等免疫检查点基因表达呈负相关,提示该类患者对ICI的疗效可能不佳。

虽然,本研究整合了来自多个数据库LSCC的相关信息,但这项研究仍有一些局限性。免疫细胞浸润的分析主要是通过基因芯片和测序数据经计算机运算预测所得,结果未必准确;在免疫细胞标志物的细胞水平分析中可能引入了系统性偏倚。因此,后续需要进行流式实验,乃至单细胞RNA测序技术进一步分析。此外,由于本研究只用了TCGA的LSCC数据进行分析,所获得的结果并不全面。同时,本研究只涉及PTHLH表达和患者的生物信息学分析,没有进行活体实验,后续需要具体的实验来阐明PTHLH的具体作用机制。未来需要进行更全面、更精确的研究,才能为这些差异提供更合理的解释。

综上,PTHLH可影响LSCC患者的生存预后,并与免疫细胞浸润和免疫反应相关,可作为ICI疗效不佳的生物标志物,这些发现可能为临床LSCC治疗提供基于免疫的抗肿瘤策略。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al.* Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21708.
- [2] HIRSCH F R, SCAGLIOTTI G V, MULSHINE J L, *et al.* Lung cancer: current therapies and new targeted treatments[J]. Lancet,

- 2017, 389(10066): 299-311. DOI:10.1016/S0140-6736(16)30958-8.
- [3] ALEXANDER M, KIM S Y, CHENG H Y. Update 2020: management of non-small cell lung cancer[J]. *Lung*, 2020, 198(6): 897-907. DOI:10.1007/s00408-020-00407-5.
- [4] ANTONIA S J, BORGHAEI H, RAMALINGAM S S, *et al.* Four-year survival with nivolumab in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer: a pooled analysis[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(10): 1395-1408[2022-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7193685/>. DOI:10.1016/S1470-2045(19)30407-3.
- [5] GARON E B, RIZVI N A, HUI R N, *et al.* Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(21): 2018-2028. DOI:10.1056/NEJMoa1501824.
- [6] GASTANAGA V M, SCHWARTZBERG L S, JAIN R K, *et al.* Prevalence of hypercalcemia among cancer patients in the United States[J/OL]. *Cancer Med*, 2016, 5(8): 2091-2100[2022-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4899051/>. DOI:10.1002/cam4.749.
- [7] O'CALLAGHAN S, YAU H. Treatment of malignancy-associated hypercalcemia with cinacalcet: a paradigm shift[J]. *Endocr Connect*, 2021, 10(1): R13-R24. DOI:10.1530/EC-20-0487.
- [8] SHIRAVAND Y, KHODADADI F, KASHANI S M A, *et al.* Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy[J]. *Curr Oncol*, 2022, 29(5): 3044-3060. DOI:10.3390/curroncol29050247.
- [9] DEPEAUX K, DELGOFFE G M. Metabolic barriers to cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(12): 785-797. DOI:10.1038/s41577-021-00541-y.
- [10] 朱晓斌, 朱敏, 张俊萍. 靶向 TIGIT、CD226、CD112R 肿瘤免疫治疗的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(2): 150-156. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2022.02.010.
- [11] PITARRESI J R, NORGARD R J, CHIARELLA A M, *et al.* PTHrP drives pancreatic cancer growth and metastasis and reveals a new therapeutic vulnerability[J/OL]. *Cancer Discov*, 2021, 11(7): 1774-1791[2022-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8292165/>. DOI:10.1158/2159-8290.CD-20-1098.
- [12] MULA R V, BHATIA V, FALZON M. PTHrP promotes colon cancer cell migration and invasion in an integrin $\alpha\beta4$ -dependent manner through activation of Rac1[J]. *Cancer Lett*, 2010, 298(1): 119-127. DOI:10.1016/j.canlet.2010.06.009.
- [13] LI J R, KARAPLIS A C, HUANG D C, *et al.* PTHrP drives breast tumor initiation, progression, and metastasis in mice and is a potential therapy target[J/OL]. *J Clin Invest*, 2011, 121(12): 4655-4669[2022-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3225988/>. DOI:10.1172/JCI46134.
- [14] MAK I W Y, TURCOTTE R E, GHERT M. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) modulates adhesion, migration and invasion in bone tumor cells[J]. *Bone*, 2013, 55(1): 198-207. DOI:10.1016/j.bone.2013.02.020.
- [15] NAGAMINE K, KITAMURA T, YANAGAWA-MATSUDA A, *et al.* Expression of parathyroid hormone-related protein confers malignant potential to mucoepidermoid carcinoma[J/OL]. *Oncol Rep*, 2013, 29(6): 2114-2118[2022-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3694618/>. DOI:10.3892/or.2013.2393.
- [16] CHANG W M, LIN Y F, SU C Y, *et al.* Parathyroid hormone-like hormone is a poor prognosis marker of head and neck cancer and promotes cell growth via RUNX2 regulation[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41131[2022-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5264159/>. DOI:10.1038/srep41131.
- [17] BHATIA V, MULA R V, WEIGEL N L, *et al.* Parathyroid hormone-related protein regulates cell survival pathways via integrin $\alpha6\beta4$ -mediated activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling[J/OL]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(7): 1119-1131[2022-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2755566/>. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-08-0568.
- [18] HASTINGS R H, MONTGRAIN P R, QUINTANA R, *et al.* Cell cycle actions of parathyroid hormone-related protein in non-small cell lung carcinoma[J/OL]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(4): L578-L585[2022-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2770787/>. DOI:10.1152/ajplung.90560.2008.
- [19] YAMADA T, MUGURUMA H, YANO S, *et al.* Intensification therapy with anti-parathyroid hormone-related protein antibody plus zoledronic acid for bone metastases of small cell lung cancer cells in severe combined immunodeficient mice[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(1): 119-126. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-08-0874.
- [20] 虞淦军, 吴艳峰, 曹雪涛. 个性化新抗原肿瘤疫苗: 道阻且长, 未来可期[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(1): 1-10. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2022.01.001.

[收稿日期] 2022-06-02

[修回日期] 2022-09-19

[本文编辑] 党瑞山